

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
в корзину
печатать
Предложения
Выход

[Предыдущий документ](#)

[Библиография](#) [Реферат](#) [Формула](#) [Рисунки](#)

№2124022. Описание

Изобретение относится к новым биологически активным сединениям, а именно к фуллереновому производному гликопептида GlcNAc-(β 1 → 4)-MurNAc-Ala-D-iGln[Lys-ε - CO(CH₂)₅-NH₆₀-H] формулы I, приведенной в формуле изобретения, обладающему адьювантной активностью.

Указанное свойство позволяет предложить возможность использования нового соединения в научно-исследовательской работе, в биотехнологии, а также медицине и ветеринарии в качестве составной части вакцин.

В настоящее время в лабораторной практике широко используются адьюванты, приготовленные на основе супензии клеточных стенок бактерий в минеральных маслах, а также адьюванты растительного происхождения. Наиболее эффективным и мощным адьювантом является полный адьюvant Фрейнда (ПАФ), представляющий собой водно-масляную эмульсию с добавлением убитых туберкулезных бацилл *Mycobacteria*.

Однако применение этого адьюванта ограничено из-за ряда побочных эффектов, обусловленных присутствием неметаболизирующего масла и убитых микобактерий. Применение ПАФ сопровождается высокой местной реакцией организма, появлением антител к микобактериям, осложняющих диагностику туберкулеза, а также высокой стоимостью этого адьюванта Murhay R. et al. Ann. Allergy, 1972, 30, p.146.

Перечисленные проблемы инициируют развитие работ по поиску новых

классов адъювантов, среди которых наибольший интерес вызывают водорастворимые низкомолекулярные синтетические адъюванты. Эти соединения имеют небольшой молекулярный вес, определенную химическую структуру и чаще всего являются фрагментами биологически активных соединений. Одним из изученных представителей синтетических адъювантов является ГМДП -N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамилдипептид, представляющий собой фрагмент клеточных стенок бактерий Titov J. et. al. Jnt. J. Peptide Protein Res. 1995, 45, 348-355. Преимуществом ГМДП перед классическими адъювантами является простота структуры, отсутствие собственной антигенности и токсичности. Однако недостаточно высокая адъюvantная активность ГМДП (так, индекс стимуляции гуморального ответа к овальбумину составляет в дозе 1,44 нмоль на мышь 1,4, а в дозе 14,4 -1,5) стимулирует поиск новых синтетических соединений, обладающих более высокой адъюvantной активностью.

Одним из таких соединений является заявляемое соединение формулы I, приведенной в формуле изобретения. Соединение I является новым неописанным ранее в научно-технической литературе. Его получают путем синтеза фуллеренового производного аминокапроновой кислоты и последующего его присоединения к лизиновому производному гликопептида.

Новое соединение представляет собой N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамил (лизил-аминокапропиофуллерен). Его структура подтверждается данными N-концевого аминокислотного анализа (отсутствие аминогрупп), данными количественного аминокислотного и аминосахарного анализа: Glc 0.93 (1), Mur 1.00 (1), Glul. 14 (1), Ala 1.15 (1), Lys 0,86 (1), аминокапроновая

кислота 0.92 (1). Продукт также охарактеризован данными ВЭЖХ на колонке Hypersil ODS (Shandon, USA) 4.0 x 150 мм в изократическом режиме в 50%-ном водном ацетонитриле при скорости потока 1 мл/мин, время удерживания соединения I составило 4,62 мин, УФ-детекция при 260 нм показала наличие 91% целевого продукта, наличие фуллерена в составе данного пика подтверждено данными УФ-спектроскопии. УФ-спектр полученного соединения в диапазоне 230 - 360 нм имеет один максимум при 260 нм.

Изобретение иллюстрируется следующим примером.

Пример.

Получение GlcNAc-(β 1 → 4)-MurNAc-Ala-D-iGln[Lys-ε - CO(CH₂)₅NHC₆₀-H] (I)

а) Синтез фуллеренаминокапроновой кислоты HC₆₀-NH-(CH₂)₅-COOH (II).

К раствору 0.03 г (0.0414 ммоль) фуллерена в 5 мл о-дихлорбензола добавляют водный раствор 0.3498 г (2.07 ммоль) калиевой соли аминокапроновой кислоты и 0.5465 г (2.07 ммоль) 18-краун-6.

Реакционную массу перемешивают 6-8 ч при 60°C. Затем растворители отгоняют, остаток обрабатывают насыщенным раствором KCl, остаток фуллеренового производного промывают водой. Выход количественный. Полученная N-(моногидро)фуллеренаминокапроновая кислота растворима в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, пиридине. С помощью аминокислотного анализа установлено, что соотношение количества найденной и вычислennой аминокапроновой кислоты в образце составляет 96. В ИК-спектрах синтезированного соединения появились полосы 1104 см⁻¹, 934 см⁻¹, 844 см⁻¹,

соответствующие полосам поглощения фуллерена с присоединенным к нему остатком одной аминокислоты, а также полосы 3438 см^{-1} и 3371 см^{-1} - $\nu\text{NH}+\nu\text{OH}$; 1560 см^{-1} и 1413 см^{-1} - νCOO^- ; 1705 см^{-1} и 1736 см^{-1} - νCOOH^- .

б) Синтез трипептида BocAla-D-Glu(Lys(Z)-OBzl)-NH₂ (III).

К раствору 2.35 г (5.7 ммоль) BocAla-D-Glu-NH₂ в 15 мл диметилформамида, охлажденному до -23°C , при перемешивании добавляют 0,82 мл (5,8 ммоль) триэтиламина и 0.56 мл (5.8 ммоль) этилхлорформиата. Через 10 мин к реакционной массе добавляют охлажденный раствор 3.15 г (5.8 ммоль) пара-толуолсульфоната Lys(Z)-OBzl и 0.82 мл (5.8 ммоль) триэтиламина в 15 мл диметилформамида и перемешивают при 20°C 15 ч. Осадок отфильтровывают, раствор упаривают при пониженном давлении, полученный продукт растворяют в этилацетате и промывают 3 раза 5%-ным раствором бикарбоната натрия, 3 раза 10%-ным раствором лимонной кислоты (3 раза), а затем водой до нейтрального значения pH. Органический слой высушивают над безводным сульфатом натрия, упаривают и перекристаллизовывают из 99%-ного этанола в гексане. Выход составляет 3.13 г (81%), т.пл. $130\text{-}137^\circ\text{C}$, [α] $D^{22} 13.8^\circ$ (с 1.8; диметилформамид).

в) Синтез лизинового производного гликопептида GlcNAc - $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -MurNAc-Ala-D-iGln(Lys) (IV).

0.67 г (1 ммоль) трипептида III обрабатывают 4 мл 70%-ной трифторуксусной кислотой в течение 0.5 ч для удаления Boc-группы, затем упаривают, добавляют толуол и упаривают еще раз. Полученный трифторацетат растворяют в 5 мл диметилформамида и добавляли к раствору 0.5 г (1 ммоль) N-изотиопирофторидина глюкозамины $(\beta 1 \rightarrow 4)$ N-

раствору 0.3 г (1 ммоль) г-ацетил-β-D-глюказамина и 0.1 г (0.14 ммоль) ацетилмурамовой кислоты и 0.14 мл (1 ммоль) триэтиламина в 5 мл диметилформамида. Через 3 ч реакционную смесь упаривают при пониженном давлении и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе хлороформ-метанол-вода 6:4:1. Фракции, содержащие защищенный гликопептид, собирают, упаривают, растворяли в 75%-ной уксусной кислоте и гидрируют над Pd-чернью в течение 3 ч. После обработки реакционной смеси получают 0.33 г (40%) GlcNAc-MurNAc-Ala-D-iGln(Lys) (IV), [α] D²⁰ -6.8° (с 0.5, вода), т. пл. 169°C. Данные аминокислотного и аминосахарного анализа Glc 0.83 (1), Mur 1.00(1), Glu 1.04(1), Ala 1.10(1), Lys 0.96 (1). По данным масс-спектроскопии МН+824. По данным ВЭЖХ на колонке Nucleosil SC8 (4x125 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.05% трифторуксусной кислоте от 2.4% до 80% за 30 мин при скорости потока 2 мл/мин время удерживания двух аномеров соединения IV составляет 2.46 мин и 3.37 мин.

г) Синтез конечного продукта (I).

Раствор 30,6 мг (36 мкмоль) соединения II и 13,6 мг (36 мкмоль) О-бензотриазол-1-ил-N, N,N',N'-тетраметилуронилгексафторфосфата (NBTU) в 1 мл диметилформамида перемешивали в течение 10 мин, затем добавляют 12,3 мкл (72 мкмоль) дизопропилэтамина, перемешивают 15 мин и добавляют 32,9 мг (40 мкмоль) производного IV. Реакционную массу перемешивают в течение 20 ч, затем упаривают и растворяют в 10 мл воды и осадок, представляющий собой фуллеренсодержащие водонерастворимые побочные продукты, отфильтровывают. Раствор центрифугируют при скорости 3000 об/мин и надосадочную жидкость, содержащую непрореагировавший аналог гликопептида IV, декантируют, операцию повторяют 5 раз. При этой

операции агрегированный целевой продукт остается в осадке, что подтверждается данными ВЭЖХ, условия которой приведены ниже. Осадок растворяли в воде и центрифугируют при скорости 500 об/мин, при этом по данным ВЭЖХ целевой продукт переходит в раствор. Раствор отделяют от осадка и лиофилизуют. Выход продукта составляет 17,9 мг (10,8 мкмоль), (30%). Продукт реакции характеризуют методом N-концевого анализа (отсутствие аминогрупп), данными количественного аминокислотного и аминосахарного анализа: Glc 0.93(1), Mur 1.00(1), Glu 1.14(1), Ala 1.15(1), Lys 0.86(1), аминокапроновая кислота 0.92(1). Целевой продукт также характеризуют данными ВЭЖХ на колонке Hypersil ODS (Shandon, USA) 4.0 x 150 мм в изократическом режиме в 50%-ном водном ацетонитриле при скорости потока 1 мл/мин, время удерживания соединения I составляет 4,62 мин, УФ-детекция при 260 нм показала наличие 91% целевого продукта, наличие фуллерена в составе данного пика подтверждено данными УФ-спектроскопии. УФ-спектр полученного соединения в диапазоне 230 нм - 360 нм имеет один максимум при 260 нм.

Проведение биологических испытаний.

а) Оценку адьювантной активности соединения 1 проводят на мышах (самках) линии Balb/c. Группы из 7 мышей иммунизируют внутрибрюшинно в 0.1 мл натрий фосфатного буфера 3 раза с 2-недельным интервалом. Первую иммунизацию производят 25 мкг овальбумина и адьюванта в дозе 1 нм, 10 нм, вторую и третью иммунизации проводят только овальбумином в половине дозы (12,5 мкг). Сыворотки отбирают на седьмой день после третьей иммунизации и тестируют методом иммуноферментного анализа. Индекс стимуляции

расчитывают как соотношение разведения тестируемой сыворотки, при котором оптическое поглощение при 425 нм равно 1, к разведению сыворотки против овальбумина без адьюванта, при котором оптическое поглощение при 425 нм равно 1.

Адьювантную активность соединения 1 оценивают по способности усиливать образование антител к овальбумину у линейных мышей. Индексы стимуляции заявляемого соединения 1 приводятся ниже в таблице.

б). Токсичность полученного соединения проверяют на мышах. При введении 1 мг заявляемого соединения на мышь в группе из 10 мышей гибели животных не наблюдается, что свидетельствует о нетоксичности заявляемого соединения.

Таким образом, синтезировано новое соединение, представляющее собой N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-аланил-D-изоглутамил (лизил-аминокапроил-фуллерен), которое нетоксично и обладает высокими адьювантными свойствами при низких дозах.

[Библиография](#)

[Реферат](#)

[Формула](#)

[Рисунки](#)

[Предыдущий документ](#)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
в корзину
печать
Предложения
Выход

Предыдущий документ**Библиография****Реферат****Описание****Рисунки****№2124022. Формула**

Фуллереновое производное гликопептида формулы
обладающее адьювантной активностью.

Библиография**Реферат****Описание****Рисунки****Предыдущий документ**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.